

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
Direktor: Professor Dr. F. W. Zilliken

**Enzymgehalte des
„braunen“ interskapularen Fettkörpers
des Meerschweinchens während
der frühen postnatalen Periode**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Claudius Hirschhäuser

aus Weilburg/Lahn

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
Direktor: Professor Dr. F. W. Zilliken

Enzymgehalte des „braunen“ interskapularen Fettkörpers des Meerschweinchens während der frühen postnatalen Periode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Claudius Hirschhäuser

aus Weilburg/Lahn

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 30. April 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. J. Hohorst

Correferent : Prof. Dr. med. W. Schmid

INHALTSVERZEICHNIS

II	<u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
II	<u>Ergebnisse</u>	
	1) Veränderungen des braunen Fettes von neugeborenen Meerschweinchen post partum in Alterabhängigkeit	
	a) Enzymchemische Veränderungen	3
	b) Histologische Veränderungen	11
	2) Veränderungen des braunen Fettes nach Kälteadaptation	
	a) Enzymchemisch	14
	b) Histologisch	19
	3) Vergleich der Enzymaktivitäten des braunen Fettes mit weißem Fett	20
III	<u>Diskussion</u>	24
IV	<u>Zusammenfassung</u>	27
V	<u>Material und Methoden</u>	
	1) Entnahme des braunen Fettgewebes	29
	2) Enzymextraktion und Beschreibung der Enzymaktivitätsmessungen	30
	3) Bestimmung von Cytochrom C+C ₁ und A	39
	4) Herstellung der histologischen Schnitte	40
VI	<u>Tabellen der gemessenen Enzymaktivitäten</u>	41
VII	<u>Literaturverzeichnis</u>	48
VIII	<u>Verzeichnis der akademischen Lehrer</u>	55
IX	<u>Lebenslauf</u>	56



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Neben dem weißen, auch als Depotfett bezeichneten Fettgewebe gibt es bei allen Hibernatoren (Johannson (27)) und vielen neugeborenen Nonhibernatoren ein weiteres Fettgewebe, das sich vom ersteren durch seine braungelbe Farbe abhebt und sich auch bei mikroskopischer Betrachtung deutlich vom Depotfett unterscheidet. Dieses Gewebe bezeichnet man als "braunes Fett" oder nach seinem histologischen Aufbau noch als plurivakuoläres oder multivakuoläres Fett.

Unter dem Mikroskop erkennt man plurivakuoläre Zellen mit reichem Protoplasmagehalt und durch Plasmabrücken getrennte Lipoidtröpfchen, während weißes Fett aus polygonalen Zellen mit großem, nicht getrenntem Fettinhalt, geringem Protoplasmagehalt und einem exzentrischen Zellkern besteht.

Braunes Fett kann interskapular, axillar, mediastinal, inguinal und perirenal lokalisiert sein, doch bestehen in den relativen Mengen deutliche Speziesunterschiede. Beim neugeborenen Meerschweinchen findet sich die Hauptmenge des braunen Fettes zwischen den Schulterblättern und beträgt dort nach Brück (13) etwa 2 % des Körpergewichtes, während die Gesamtmasse des braunen Fettes etwa 5 % ausmacht. Beim Igel, einem Winterschläfer, sitzt der Hauptanteil zwischen der Nacken-, oberen Extremitäten- und Rückenmuskulatur und beträgt dort im Sommer 2.4 % des Körpergewichtes (58).

Seitdem braunes Fett erstmals von Gessner (21) 1551 beschrieben wurde, war die Frage nach der Funktion Anlaß zu Forschung und Diskussion. Rasmussen (38) nennt 4 Perioden (zitiert nach Johannson (27)):

1670 - 1817 wird braunes Fett als Thymusgewebe aufgefaßt.

1817 - 1863 wurde dem braunen Fett eine Funktion als endokrine Drüse zugeschrieben.

1863 - 1902 sah man in dem braunen Fett ein spezifisches Gewebe mit Speicherfunktion.

1902 - ca. 1961 wurde braunes Fett erneut als endokrine Drüse erörtert.

Erst seit 1963 weiß man aus Untersuchungen von Smith (46-52), daß braunes Fettgewebe bei Winterschläfern und nicht winterschlafenden, neugeborenen Säugetieren eine wohldefinierte Funktion im Wärmehaushalt hat.

Die vorliegende Arbeit greift drei Problemstellungen auf:

1). Es erschien wünschenswert, Weiterführendes über den Stoffwechsel des braunen Fettes und speziell über seine Enzymsysteme auszusagen. In der Literatur liegen Untersuchungen von Creasey und Gray (15), Eichel (17), Joel und Ball (28), Kornacker und Ball (31), Shapiro und Wertheimer (44), Treble und Ball (54), Weber (56), und Wise und Ball (57) vor. Untersuchungen die einzelne Enzyme unter speziellen Fragestellungen betreffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Enzymmuster des braunen Fettes aufgestellt. Neben glykolytischen Hauptkettenenzymen wurden Pentose-Phosphat-Shunt- und Citratcyclusenzyme bestimmt. Die Untersuchung wurde an braunem interskapularem Fett neugeborener Meerschweinchen durchgeführt.

2). Der interskapuläre Fettkörper ändert sich während der postnatalen Entwicklung von Meerschweinchen wie folgt:

- a). Makroskopisch in der Farbe von braun zu hellbraun-weißlich.
- b). histologisch, indem aus plurivakuolären braunen Fettzellen univakuoläre Fettzellen werden.
- c). funktionell, indem post partum die Fähigkeit der zusätzlichen Chemothermogenese bei Kältebelastung oder bei Noradrenalin-Gabe abnimmt (Brück und Wünneberg (5, 6)).

Somit ergab sich die Frage, ob und welche Veränderungen des Enzymmusters sich neben den histologischen und makroskopischen Veränderungen des braunen Fettgewebes während der postnatalen Entwicklung nachweisen lassen.

3). Page und Babienaut (37) stellten erstmals während langfristiger Kältebelastung bei Ratten fest, daß die Gesamtmasse des braunen

Fettgewebes - bezogen auf das fettfreie Trockengewicht - anstieg. Darüberhinaus fand sich auch eine Erhöhung des Ascorbinsäuregehaltes (37, 20). Neben dem Anstieg des Gewichtes von braunem Fett ergab sich in einer späteren Untersuchung von Smith und Roberts (52) nach Kältebelastung ein Temperaturanstieg im braunen Fett der Ratte. Damit stellte sich uns die Frage: Welche Veränderungen zeigen sich enzymchemisch und histologisch, wenn man Meerschweinchen post partum bei niedrigen Temperaturen aufzieht?

II. ERGEBNISSE

II. 1a Enzymchemische Veränderungen des interskapularen Fettkörpers des Meerschweinchens post partum

Am interskapularen Fettkörper wurden folgende Enzyme untersucht:

1). Glykolytische Hauptkettenenzyme

Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH),
Lactatdehydrogenase (LDH), Pyruvatkinase (PK),
Hexokinase (HK), Aldolase (Ald.), Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (GDH).

2). Pentose-Phosphat-Shuntenzyme

Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH),
6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGDH).

3). Citratcyclusenzyme

Malatdehydrogenase (MDH), die NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase (IDH).

4). An rein mitochondrialen Enzymen wurden die Cytochrome gemessen und zwar Cytochrom C + C₁ und Cytochrom A.

5). Ferner das Malic-Enzyme (ME).

Die Aktivitäten aller dieser Enzyme wurden bei Meerschweinchen post partum (1 Tag alt) und an 5, 10, 15 und 20 bis 22 Tage alten Tieren gemessen; die Aufzucht der Tiere erfolgte bei Zimmertemperatur.

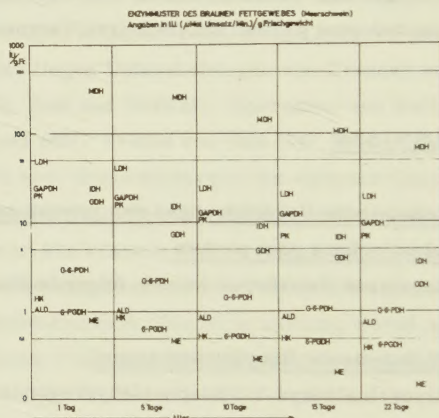


Abb. 1 : Enzymmuster des braunen Fettgewebes (Meerschweinchen) eines 1-Tage, 5-Tage, 10-Tage, 15-Tage und 22-Tage alten Tieres. Angaben in IU/g. Frischgewicht.

Betrachtet man die Enzymaktivitäten, bezogen auf Gramm/Frischgewicht (Abb. 1, Tab. 1 und 3) in Abhängigkeit vom Alter, so ergibt sich ein allgemeiner, gleichmäßig erscheinender Aktivitätsverlust aller Enzyme. Diese ziemlich kontinuierliche Abnahme der Aktivität ist offensichtlich zum Teil auf dem Schwund des Cytoplasmagehaltes infolge Fetteinlagerung und Zunahme des Wassergehaltes zurückzuführen. Das kommt deutlich in der Abnahme des extrahierbaren, löslichen Proteins zum Ausdruck (s. Abb. 4). Daher lassen sich aus dieser Darstellung, in der die Enzymaktivität auf g-Frischgewicht

bezogen ist, etwaige charakteristische Veränderungen einzelner Enzyme nicht entnehmen.

Bezieht man die Enzymaktivität auf 100 mg extrahierbares Protein (Abb. 2, Tab. 2 und 4), so sieht man auch bei dieser Darstellung nur geringfügige Änderungen der Enzyme MDH, LDH, GAPDH, PK, HK, G-6-PDH und 6-PGDH im Laufe der postnatalen Entwicklung, daß aber die Enzyme LDH, GDH und das ME evidente Aktivitätsverluste zeigen.

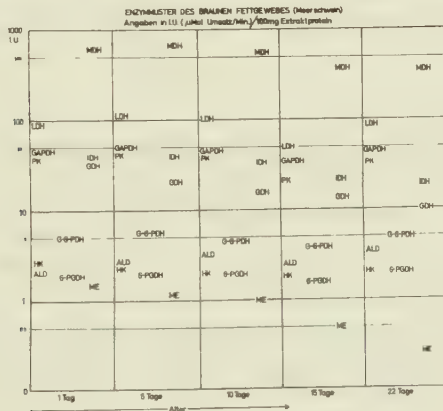


Abb. 2 : Enzymmuster des braunen Fettgewebes (Meerschweinchen) eines 1-Tage, 5-Tage, 10-Tage, 15-Tage und 22-Tage alten Tieres. Angaben in IU/100 mg Extraktprotein.

Eine interessante Veränderung in der Altersabhängigkeit zeigt das Enzym Aldolase, dessen Aktivität im interskapularen Fettkörper bis zum 3 Wochen alten Tier etwa auf das Doppelte ansteigt. Wenn

man die Aldolase als repräsentativ für die Aktivität der Glykolysekette nimmt, würde aus dem Anstieg der Aldolaseaktivität während der postnatalen Entwicklung eine Zunahme der glykolytischen Kapazität des interskapularen "braunen" Fettes folgern. Tatsächlich haben Brück und Wünnenberg (7) gezeigt, daß der respiratorische Quotient unter Normaltemperaturbedingungen von 0.86 (Fettoxydation) im Verlauf von 3 Wochen fast an 1 herankommt. Sowohl der Aktivitätsanstieg der Aldolase, als auch der Abfall der vorher genannten Enzyme, kommen besser zu Gesicht, wenn man die Enzymaktivität auf das oxydative Gärungsenzym, die GAPDH, bezieht (Abb. 3), die während der postnatalen Entwicklung keine wesentlichen Aktivitätsveränderungen zeigt (vergleiche Abb. 2)

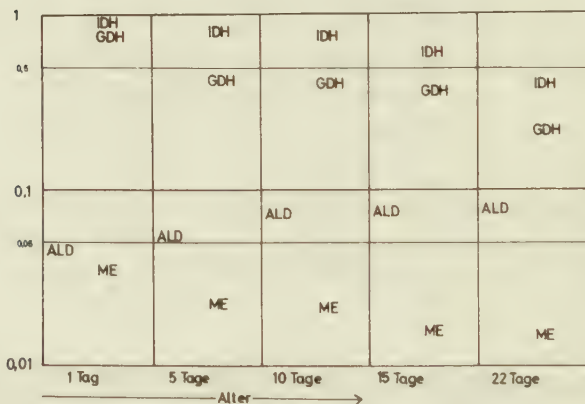


Abb. 3: Enzymaktivitäten des braunen Fettgewebes eines 1-Tage, 5-Tage, 10-Tage, 15-Tage und 22-Tage alten Meerschweinchens, bezogen auf das oxydative Gärungsferment (GAPDH).

In dieser Darstellung kommt nochmals deutlich zum Ausdruck:

- 1). der Abfall der IDH, der GDH und des ME
- 2). der Anstieg der Aldolase.

Auch die Gehalte der Atmungsfermente Cytochrom C + C₁ und A nehmen während der postnatalen Entwicklung im braunen Fett ab.

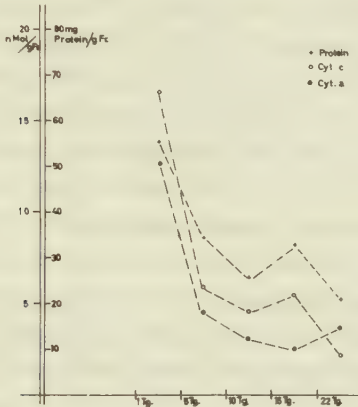


Abb. 4: Cytochrom C + C₁ O-O und Cytochrom A . . Gehalte des braunen interskapularen Fettgewebes von Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen. Angaben: Cytochrom n-Mol/g-Frischgewicht; Proteingehalte in mg/g-Frischgewicht + - +

Bei der Betrachtung der Messwerte - bezogen auf g-Frischgewicht (Abb. 4) zeigt sich ein sehr starker Abfall der Cytochromgehalte vom 1. bis zum 5. Tag post partum um ungefähr einen Faktor 3.

Der Cytochromabfall kann entweder als Mitochondrienschwund oder als eine Veränderung der Mitochondrienstruktur mit Abnahme des Cytochromgehaltes, bezogen auf die Mitochondrienmasse, gedeutet werden. In jedem Fall ist sie Ausdruck einer verminderten Atmungskettenkapazität (siehe Diskussion). Vergleicht man den am ersten Tag gemessenen Cytochromwert mit dem nach 3

Wochen Lebenszeit, so findet sich ein Abfall von Cytochrom C und A, für Cytochrom C + C₁ um einen Faktor 5, für Cytochrom A um einen Faktor 3,5. Als weiterer Befund ergibt sich eine Umkehrung des Cytochrom C- und A-Verhältnisses mit zunehmendem Alter. Bei dem 1-Tage alten Tier betrug das Verhältnis der Summe von Cytochrom C und Cytochrom A = 1.3 und entsprach etwa dem von Klingenberg und Schollmeyer (43) mitgeteilten Quotienten in anderen Geweben, jedoch darf der geringe Abfall von Cytochrom A und damit der Anstieg des Quotienten nicht überbewertet werden, da die Cytochrome am trüben Gesamtfettextrakt bestimmt wurden.

Stratmann und Hohorst (53) konnten auch einen Anstieg des Cytochromquotienten an isolierten Mitochondrien von 1.7 auf 2.9 in Altersabhängigkeit finden (siehe Diskussion).

Auffallend ist der relativ hohe Cytochrom C-Gehalt des Neugeborenen mit 16.3 n-Mol/g-Frischgewicht. Dieser hohe Cytochrom C-Gehalt und die starke Durchblutung dürften im wesentlichen die braune Farbe des interskapularen Fettkörpers bedingen. Die Frage der Farbentstehung ist jedoch noch nicht ganz geklärt. Smalley (45) nimmt Flavin-Mono-Nucleotid-Indol-Komplexe an, die neben dem Cytochrom und Hämoglobin an der Farbbildung beteiligt sind. Vergleicht man den Cytochrom C-Gehalt des braunen Fettes mit anderen Geweben (Abb. 5), so läßt sich erkennen, daß nach dem Herzmuskel und den Nebennieren das braune Fett den höchsten Cytochrom C-Gehalt zeigt. Das wird besonders deutlich, wenn man nicht auf Frischgewicht, sondern auf das fettfreie Trockengewicht bezieht. Joel und Ball (28) schätzen, daß mehr als 20 % des gesamten Cytochrom C-Gehaltes des winterschlafenden amerikanischen Erdhörnchens auf das braune Fett entfällt. Bei ersten, vergleichenden Untersuchungen über

CYTOCHROM c GEHALT IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN ***

GEWEBE	CYTOCHROM c	
	mμ Mol / g Trockengew. (exsiccata)	mμ Mol / g frisch
BRAUNES FETT (MEERSCHW INTERSCAP)	134,0	16,6
BRAUNES FETT (RATTE INTERSCAP)	184,0	23,0
HERZMUSKEL*	250,0	50,0
NIERENRINDE*	252,0	44,5
LEBER*	70,0	20,5
SKELETTMUSKEL*	63,2	11,5
HIRNRINDE*	74,5	11,5

*** CYTOCHROM c - c.

** nach JOEL Handbook Physiol. 1965

* nach SCHOLLMAYER Biochem. Z. 335

Abb. 5 : Cytochrome C Gehalt in verschiedenen Geweben

Cytochromgehalte des braunen Fettes verschiedener Spezies konnten bei dem winterschlafenden Siebenschläfer (*glis glis*) Cytochrom C-Werte von 70 bis 80 n-Mol/g-Frischgewicht und Cytochrom A von 40 n-Mol gemessen werden.

Bezieht man die gemessenen Cytochromwerte auf das Schlüsselenzym GAPDH (Abb. 6), so zeigt sich der Abfall der Cytochromwerte in den ersten 5 bis 7 Lebenstagen noch deutlicher. In den weiteren Lebenstagen, bis zu 3 Wochen hin, wird der Abfall geringfügiger. Der Rückschluß, daß es sich beim braunen Fett um ein sehr mitochondrienreiches Gewebe handelt, stimmt mit den elektronenoptischen Untersuchungen von Napolitano et al. (36) überein. Daraus geht weiterhin hervor, daß die Mitochondrien durch eine hohe Cristaedichte ausgezeichnet sind. Ein Beispiel hierfür zeigt eine elektronenoptische Aufnahme isolierter Mitochondrien aus dem braunen Fett des Igels.

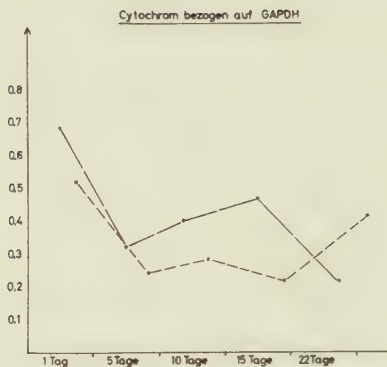


Abb. 6: Cytochrom bezogen auf GAPDH; Cytochrom C + C₁ — — —
Cytochrom A ----

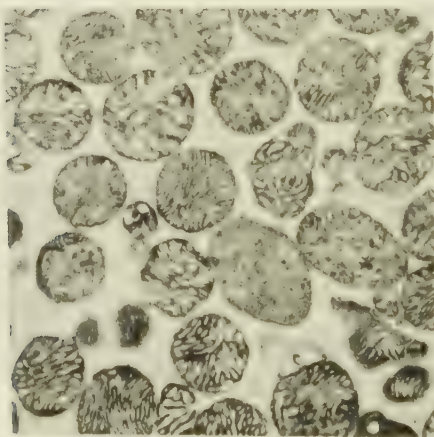


Abb. 7: Isolierte Mitochondrien aus braunem Fett vom Igel
15 000-Fach vergrößert ^{x)}

x) Für die elektronenoptische Aufnahme danke ich Herrn Doz.
Dr. Stadhouders, Abtl. f. Exlektronenmikroskopie der Uni-
versität Nijmegen.

Stratmann und Hohorst (53) konnten zeigen, daß die Cristaedichte in den Mitochondrien des interskapularen Fettkörpers der neugeborenen Meerschweinchen während der postnatalen Entwicklung stark abnimmt und die Mitochondrien das Aussehen typischer, weißer Mitochondrien erhalten. Wenn man weiter berücksichtigt, wie in Abb. 4 gezeigt, daß der Cytochromgehalt des braunen Fettgewebes und der Gehalt an löslichem Protein während der postnatalen Entwicklung in den ersten Tagen nahezu absinkt, dann würde die Verminderung der Atmungskapazität des Gewebes im wesentlichen durch eine Änderung der Mitochondrienstruktur und Funktion, und weniger auf eine Abnahme der Mitochondrienzahl pro Zelle bedingt sein.

II. 1 b) Histologische Veränderungen des braunen Fettgewebes post partum

Es wurden Fettanteile

- 1). eines Meerschweinchens post partum
- 2). eines 4 Tage alten Tieres
- 3). eines 8 Tage alten Tieres

histologisch untersucht. Dabei wurde der gesamte interskapuläre Fettkörper herausgenommen, in Paraffin eingebettet und flächförmig aufgeschnitten, um eine histologische Differenzierung zwischen dem kaudalen und kranialen Anteil zu ermöglichen. Betrachtet man das histologische Bild des interskapularen Fettkörpers eines 1 Tage alten Meerschweinchens (Abb. 8 und 9), so läßt sich die typisch histologische Struktur des braunen Fettgewebes, wie sie in der Einleitung beschrieben wurde, erkennen.

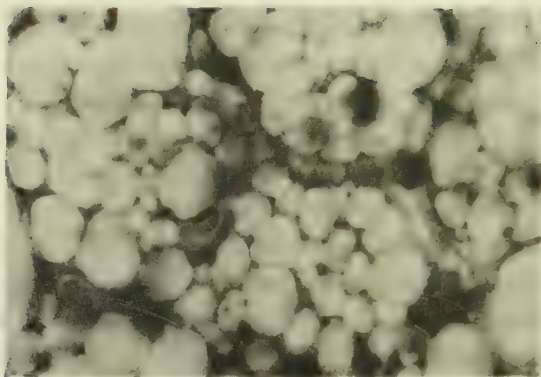


Abb. 8 : braunes Fettgewebe eines neugeborenen (O - 24 h)
Meerschweinchens. Hämatoxylin nach Heidenhain 800-fach.

Beim 4 Tage alten Tier (Abb. 10) lassen sich morphologisch schon Veränderungen des kaudalen Fettanteiles erkennen und zwar verschwindet die multivakuoläre Struktur und es entstehen große , wabenförmige Fettzellen mit schmalen Protoplasmasaum. Bei Betrachtung des histologischen Schnittes des interskapularen braunen Fettes eines 8-Tage alten Meerschweinchens läßt sich noch in den obersten, kranialen Abschnitten plurivakuoläres Gewebe finden, während der übrige Hauptanteil die Struktur eines weißen Fettgewebes hat. Nach dem morphologischen Bild kann man sagen, daß beim 8 Tage alten Tier (Abb. 11) das braune Fett zum größten Teil in "weißes" Fett umgewandelt ist. Untersucht man die Fettkörper eines 15-Tage alten Tieres, so findet sich histologisch keine wesentliche Veränderung mehr gegenüber dem eines 8-Tage alten Tieres. Die histologischen Veränderungen des braunen Fettes in den ersten 8 Lebenstagen gehen also parallel mit dem Cytochrom- und Proteinschwund des Erwachsenen, der ebenfalls im wesentlichen in den ersten Lebenstagen eintritt.

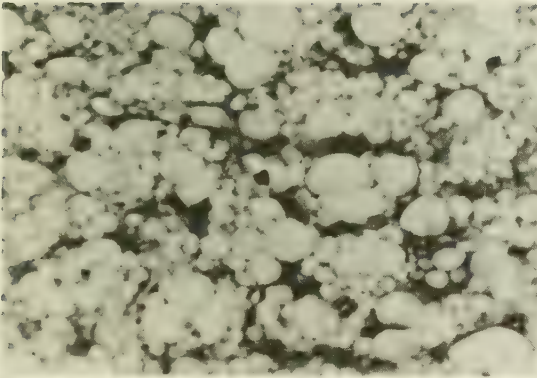


Abb. 9 : Braunes Fettgewebe eines neugeborenen Meerschweinchens
(0-24 Stunden post partum) Hämatoxylin nach Heidenhain
400-fach. .

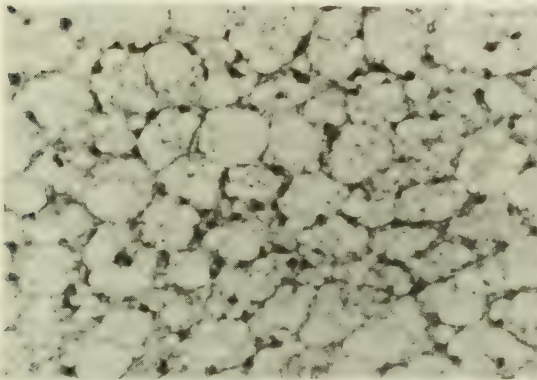


Abb. 10 : Braunes Fettgewebe eines 4-Tage alten Meerschweinchens;
Hämatoxylin nach Heidenhain 400-fach.

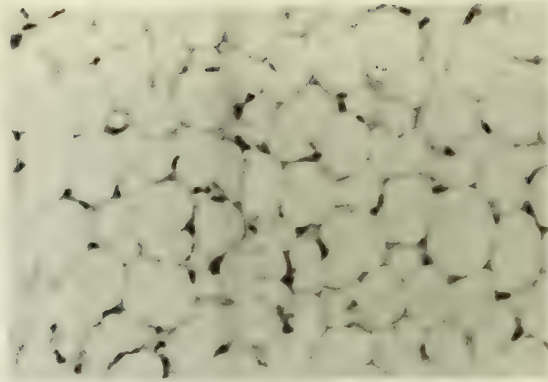


Abb. 11 : Braunes Fettgewebe eines 8-Tage alten Meerschweinchens;
Hämatoxylin nach Heidenhain 400-fach.

II. 2 a). Enzymatische Veränderungen nach Kälteadaption

Neugeborene Meerschweinchen wurden direkt nach der Geburt bei 8°C aufgezogen. Die Tiere wurden nach einer Kälteadaption von 15 - 16 Tagen untersucht. Dabei zeigt sich :

- 1). Makroskopisch: Persistenz der braunen Farbe des interskapularen Fettkörpers im Gegensatz zur Wärmeaufzucht.
- 2). Histologisch : Persistenz der für braunes Fett typischen plurivakuolären Struktur.

Vergleicht man nun die Mittelwerte der Enzymaktivitäten des interskapularen Fettes der unterkühlten Tiere, bezogen auf g-Frischgewicht mit den Werten der 1 Tage alten Tiere und den 15 Tage alten Tieren, die bei Normaltemperatur aufgezogen wurden (Abb. 12), so läßt sich bei den unterkühlten Tieren, verglichen mit dem 1-Tage alten Tier, nur ein geringfügiger Anstieg der Enzymaktivität der Enzyme MDH, LDH, GAPDH, PK und der Aldolase erkennen.

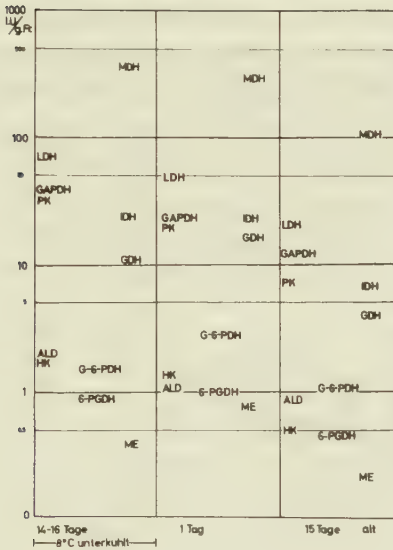


Abb. 12 : Enzymaktivitäten des braunen interskapularen Fettkörpers eines 14 - 16 Tage alten Tieres in der Kälte aufgezogen. Enzymwerte des braunen Fettes eines 1-Tage alten Tieres. Enzymwerte eines 15-Tage alten, bei Normaltemperatur aufgezogenen, Tieres. Angaben in IU/g Frischgewicht.

Einen Aktivitätsverlust um ungefähr einen Faktor 2 zeigt das Malic-Enzyme. Dieser Abfall ist geringfügiger als der bei den Normal-

temperaturen aufgezogenen Tieren. Änderungen lassen sich auch bei der GDH und der G-6-PDH zu einem Aktivitätsverlust hin erkennen.

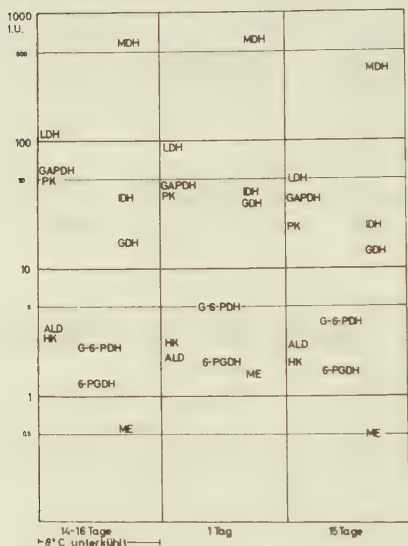


Abb. 13 : Enzymaktivitäten des braunen interskapularen Fettkörpers eines 14 - 16 Tage alten Tieres in der Kälte aufgezogen. Enzymwerte des braunen Fettes eines 1-Tage alten Tieres. Enzymwerte eines 15-Tage alten, bei Normaltemperatur aufgezogenen Tieres. Angaben in IU/100 mg extrahierbares Protein.

Bezieht man nun die Enzymaktivitäten auf extrahierbares Protein (Abb. 13), so lassen sich bei den kälteadaptierten Tieren, verglichen mit dem Status post partum, gleichbleibende Gehalte der Enzyme MDH, HK und IDH erkennen. Eine nur geringe Steigerung in der Aktivität sieht man bei den Enzymen LDH, GAPDH und PK. Einen geringfügigen Aktivitätsabfall dagegen zeigen die Pentose-Shunt-Enzyme G-6-PDH und 6-PGDH, wie es sich ähnlich auch bei den, bei Normaltemperatur aufgezogenen, gleichaltrigen Tieren zeigt. Zur Diskussion dieser Befunde siehe Seite 23 und 25. Auch findet sich ein Anstieg der Aldolase wie wir ihn bei der natürlichen Involution des 15-Tage alten Tieres sehen, sowie eine Umkehrung des Aldolase-Hexokinase-Verhältnisses mit höherem Aldolase-Hexokinase-Quotienten.

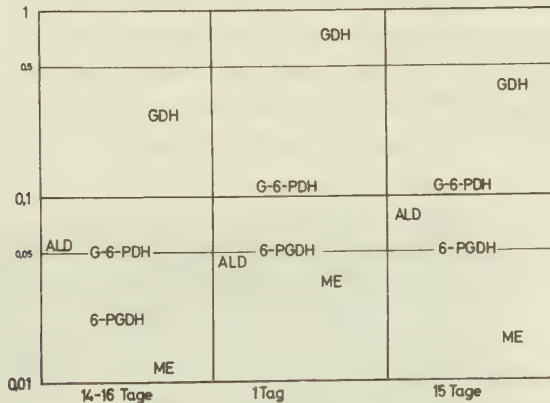


Abb. 14: Enzymwerte des braunen interskapularen Fettkörpers eines 14 - 16-Tage alten Tieres in der Kälte aufgezogen. Enzymwerte des braunen Fettes eines 1-Tage alten Tieres. Enzymwerte eines 15-Tage alten, bei Normaltemperatur aufgezogenen, Tieres. Enzymaktivität bezogen auf GAPDH.

In der Abbildung 14 wird das Verhalten der Enzyme GDH, Aldolase, G-6-PDH, 6-PGDH und das ME, bezogen auf GAPDH, nochmals hervorgehoben. Man erkennt den stärkeren Abfall der Aktivitäten der Enzyme GDH, G-6-PDH, 6-PGDH, verglichen mit den bei Wärme aufgezogenen Tieren.

Die Atmungsfermente zeigen bei den kälteadaptierten Tieren einen Anstieg und zwar für Cytochrom C um etwa 4 n-Mol/g-Frischgewicht, für Cytochrom A einen Abfall um etwa 2 n-Mol/g-Frischgewicht.

LOSliches PROTEIN UND CYTOCHROME IM BRAUNEN FETT
BEI WÄRME- UND KÄLTEAUZUCHT (MEERSCHWEIN INTER-
SCAPULARFETT)

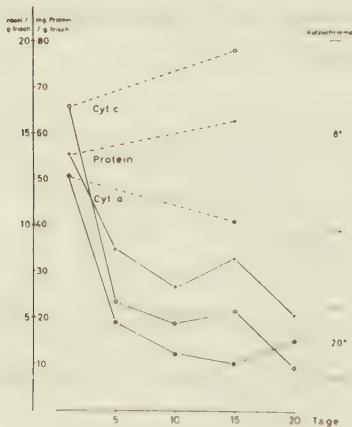


Abb. 15 : Lösliches Protein und Cytochrome im braunen Fett bei Wärme- und Kälteaufzucht (Meerschweinchen Interscapularfett)

Die dargestellten Enzymwerte zeigen deutlich, daß bei kälteadaptierten Tieren die für die postnatale Entwicklung bei Wärmeaufzucht charakteristische Abnahme des Cytochromgehaltes und des löslichen Proteins ausbleibt. Mit anderen Worten gesagt : die hohe Atmungskettenkapazität des braunen Fettes, für die die Enzyme als Para-

meter zu betrachten sind, bleibt bei Kälteadaption erhalten, während bei der natürlichen Aufzucht bei Normaltemperatur die Stoffwechselaktivität abnimmt. Augenscheinlich ist diese Fähigkeit die Funktion und Struktur des braunen Fettes durch Kältebelastung zu erhalten bei Meerschweinchen auf das neugeborene Tier beschränkt. Bei älteren in Wärme aufgezogenen Meerschweinchen; durch Kältebelastung eine Rückumwandlung des interskapularen Fettkörpers in typisches braunes Fett zu erzielen, zeigte in vorläufigen Versuchen nur geringen Erfolg (Hohorst unveröffentlichte Versuche).

II. 2 b). Histologische Untersuchung des Fettkörpers von kälte-adaptierten Tieren

Vergleicht man das histologische Bild des braunen Fettes des neugeborenen mit dem 2 Wochen alten Tier, bei 8°C aufgezogen, so läßt sich morphologisch kein Unterschied feststellen. Es zeigen sich überall plurivakuoläre Zellen mit großem Protoplasmareichtum.

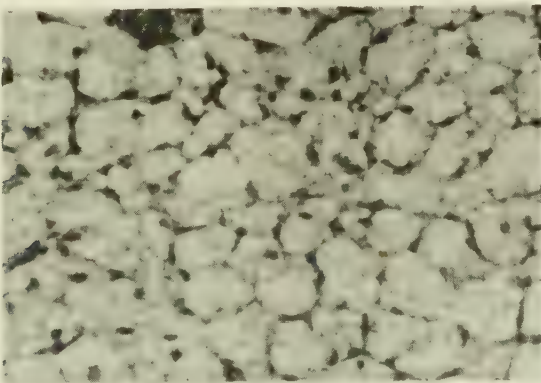


Abb. 16: Braunes Fettgewebe eines 14-16 Tage bei 8°C aufgezogenen Meerschweinchens, Hämatoxylin nach Heidenhain 400-fach.

Wie im vorangegangenen Kapitel geschildert wurde, sieht man bei normaler Aufzucht, d. h. bei 28°C , bereits die ersten histologischen Veränderungen nach 4 Tagen (siehe Abb. 10), während wir in dem Falle der Kälteaufzucht keine histologischen Veränderungen im Zeitpunkt von 14 Tagen finden.

Es lassen sich also, wie auch Brück und Wünnenberg (10) fanden, evidente Unterschiede im histologischen Bild des braunen Fettes des 15 Tage alten, bei Normaltemperatur (25°C) aufgezogenen Tieres feststellen. Im ersten Fall findet sich eine Struktur, die vom histologischen Bild mit der des weißen Fettes identisch ist; im zweiten Fall sieht man das für das braune Fett charakteristische Bild.

II 3). Vergleich der Enzymaktivitäten des braunen Fettgewebes mit weißem Fett

Vergleicht man (siehe Abb. 1) die in dieser Arbeit bestimmten Enzymaktivitäten des braunen Fettes - gewählt wurde das interskapulare Fettgewebe von neugeborenen Tieren und Tieren, die 14 - 16 Tage kälteadaptiert wurden - mit dem Abdominalfett des erwachsenen Meerschweinchens, das als repräsentativ für weißes Fett gelten kann, so läßt sich bei Bezug der Enzymaktivitäten auf g-Frischgewicht eine allgemeine höhere Aktivität der Enzyme des braunen Fettes ansehen (Abb. 17).

Die Citratcyclusenzyme MDH und IDH zeigen beim braunen Fett des neugeborenen Meerschweinchens eine um ungefähr einen Faktor 10 höhere Aktivität. Ferner zeigt die Aldolase beim weißen Fett eine um einen Faktor 3 höhere Aktivität, während HK einen Anstieg um etwa 30 % zeigt, sodaß sich das Verhältnis Aldolase zu HK verändert. Der Anstieg der Aldolase läßt sich auch bei der postnatalen Involution des braunen Fettes des Meerschweinchens,

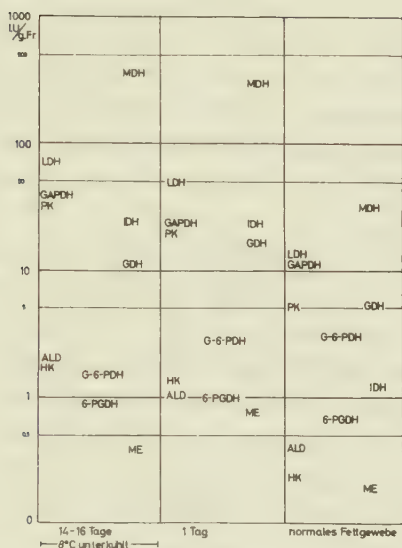


Abb. 17: Enzymaktivitäten des braunen Fettgewebes eines 14 - 16 Tage alten, postnatal in Kälte aufgezogenen, Tieres (N = 6). Enzymaktivitäten des braunen Fettes eines neugeborenen Tieres (n = 12) Enzymaktivitäten des weißen Abdominalfettes von erwachsenen Meerschweinchen (n = 4). Angaben in IU/g-Frischgewicht.

wie oben beschrieben wurde, verfolgen. Bezieht man die Enzymaktivitäten auf 100 mg extrahierbares Protein (Abb. 18), so findet man außerdem, daß die Aktivität der Pentose-Phosphat-Shunt-Enzyme G-6-PDH und 6-PGDH beim braunen Fett um etwa einen Faktor 4 niedriger ist als beim weißen Fettgewebe. Ein Hauptunterschied zwischen braunem und weißem Fett läßt sich sicher in den Atmungsfermenten erkennen, die im braunen Fett wesentlich höhere Gehalte zeigen als im weißen. Im weißen Fett konnten die Cytochrome bei

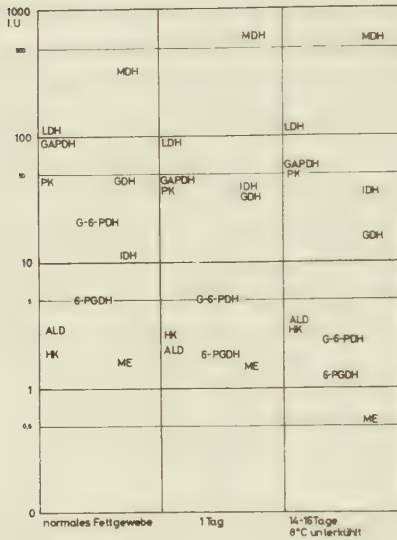


Abb. 18 : Enzymaktivitäten des braunen Fettgewebes eines 14 - 16-Tage alten, postnatal in Kälte aufgezogenen Tieres. Enzymaktivitäten des braunen Fettes eines neugeborenen Tieres; Enzymaktivitäten des weißen Abdominalfettes von erwachsenen Meerschweinchen. Angaben in IU/100 mg Extraktprotein.

Anwendung der Methode von Klingenberg und Schollmeyer (43) nicht bestimmt werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 10^{-9} M für Cytochrom C + C₁ und Cytochrom A.

Im Test also ist der Cytochromwert im braunen Fett von 1-Tage alten Tieren etwa um einen Faktor 160 höher als der nicht exakt meßbare Wert im weißen Abdominalfett. Hohe Aktivitäten der Citratcyclusenzyme und der Cytochrome im braunen Fett lassen auf einen wesentlich höheren Mitochondriengehalt des braunen Fettes schließen.

Vergleicht man nun das weiße Abdominalfettgewebe mit dem interskapularen Fettkörper des bei 25° C aufgezogenen, 3 Wochen alten

Tieres (siehe Abb. 1), so erkennt man, daß die Citratcyclusenzyme MDH und IDH ungefähr dem Wert des weißen Fettes entsprechen. Ein deutlicher signifikanter Aktivitätsunterschied besteht in den Pentose-Shunt-Enzymen G-6-PDH und 6-PGDH. Die Wahrscheinlichkeit, daß die gefundenen Unterschiede der Mittelwerte nur auf Zufall beruhen, beträgt für G-6-PDH 1 % und für 6-PGDH weniger als 1‰ .

Die höheren Spiegel der beiden Shunt-Dehydrogenasen im weißen Fett wurden von Schmidt (45) - verglichen mit den Werten der Leber - als charakteristisch für weißes Fett beschrieben. Auch Weber et al. (58) fanden beim weißen Fett der Ratte höhere Aktivitäten dieser Enzyme gegenüber der Rattenleber. Demgegenüber zeigen die glykolytischen Enzyme des Fettgewebes, verglichen mit denen der Leber, nur 1/10 bis 1/3 der Aktivität. Möglicherweise kann der Unterschied in den Pentose-Shunt-Enzymen zwischen Interskapularfett 3-Wochen alter Tiere und weißem Abdominalfett, als Hinweis dafür gelten, daß die postnatale Involution der braunen Fettzelle doch nicht auf einer Umformung in " echte " univakuoläre weiße Fettzellen beruht. Die meisten Enzyme zeigen nahezu identische Aktivität mit Ausnahme der GDH, sodaß sie für die Frage, ob sich braunes Fett postnatal in 3 Wochen zu " echtem " weißen Fett umwandelt oder ob es " braunes " Fett bleibt, keine Kriterien liefern.

III. DISKUSSION

Die in der Arbeit gezeigten Veränderungen der enzymatischen Kapazität des interskapularen Fettgewebes des Meerschweinchens nach der Geburt und das weitgehende Ausbleiben dieser Veränderungen bei Kälteaufzucht der Tiere deuten darauf hin, daß es sich hier nicht einfach um eine altersabhängige, einseitig gerichtete Involution des braunen Fettgewebes handelt, sondern um eine Differenzierung und Anpassung des Gewebes an wechselnde, äußere Bedingungen.

Mit dem gleichzeitigen Verlust der Fähigkeit zur zusätzlichen, chemischen Wärmebildung durch Oxydation von langkettigen Fettsäuren, ist auf molekularer Ebene ein Verlust an mitochondrialer Aktivität verbunden, welcher sich u. a. in der Abnahme der Cytochromgehalte dokumentiert. Dieser Schwund an Atmungspigmenten ist nicht allein durch eine verminderte Mitochondriendichte im Fettgewebe bedingt, sondern auch durch eine Abnahme des Cytochromgehaltes im Chondriom im Verlauf der postnatalen Involution (Stratmann, Hohorst (53)). Beide Faktoren, abnehmende Mitochondrienzahl und verminderte Atmungskettenkapazität des Chondrioms, sind die Ursache für die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs des Gewebes während der postnatalen Veränderungen des braunen Fettgewebes. Neben dem mitochondrialen Aktivitätsschwund des interskapularen Fettgewebes des Meerschweinchens nach der Geburt bei Wärmeaufzucht und dem Ausbleiben dieser Wirkung bei Aufzucht in der Kälte, treten Veränderungen des Enzymmusters des Emden-Meyerhof-Cyclus und des Pentose-Phosphat Shunts völlig zurück; die Bewegungen der für die genannten Stoffwechselketten repräsentativen Enzyme folgen im wesentlichen den Bewegungen des löslichen Extraktproteins. Sie sind damit lediglich Ausdruck

der in den histologischen Bildern dokumentierten Veränderungen der Fett-Cytoplasmarelation des Gewebes unter den untersuchten Bedingungen.

Die Frage, ob die geschilderten Enzymbewegungen im interskapularen Fettkörper während der frühen Postnatalperiode des Meerschweinchens auf der Differenzierung eines einheitlichen Zelltypes - der multilokulären "braunen" Fettzellen des Neugeborenen - oder auf einer Veränderung der Zellpopulation mit fortschreitendem Ersatz der ursprünglich vorhandenen multilokulären "braunen" Fettzellen durch unilokuläre "weiße" Fettzellen, berührt das noch nicht endgültig gelöste Problem der Herkunft und Entwicklung des braunen Fettgewebes (26). Weder das histologische Bild noch das Enzymmuster des interskapularen Fettkörpers nach drei Wochen Wärmeaufzucht geben eindeutige Unterscheidungsmerkmale gegenüber gewöhnlichem, weißem Fettgewebe mit Ausnahme der Pentose-Phosphat-Shunt-Enzyme G-6-PDH und 6-PGDH, die aber trotz ihres signifikanten Unterschiedes in ihrer Bedeutung nicht überwertet werden dürfen. Somit liegt der Rückschluß nahe, daß die braunen Fettzellen des Neugeborenen zu weißen Fettzellen geworden sind. Daraus würde weiter folgen, daß die geschilderten Enzymveränderungen insbesondere auf dem Schwund an mitochondrialer Aktivität während der postnatalen Involution und das Ausbleiben dieser Effekte in der Kälte auf Enzymrepressionen bzw. -induktionen in den multilokulären "braunen" Fettzellen beruhen. Gegen eine derartige Annahme sprechen indes sowohl elektronenmikroskopische Befunde von multilokulären und unilokulären Fettzellen (Hull (26)) während verschiedener Entwicklungsstadien als auch Aufnahmen von isolierten Mitochondrien. Ebenso sprechen dagegen Untersuchungen über den Wandel der Enzymgarnitur isolierter Mitochondrien des interskapularen Fettgewebes des Meerschweinchens während der postnatalen Involution (Stratmann, Hohorst (53)). Letztere haben derart tiefgreifende Veränderungen der Mitochondrienstruktur und Funktion während der postnatalen Involution des interskapularen Fettkörpers der Meer-

schweinchens erkennen lassen, daß sie nach dem heutigen Wissensstand über die Mitochondrienentstehung und - Entwicklung schwerlich auf einen einheitlichen Mitochondrientyp bezogen werden können. Zum jetzigen Zeitpunkt wird man also annehmen dürfen, daß multilokuläre "braune" und unilokuläre "weiße" Fettzellen sich in Herkunft und Entwicklung unterscheiden und nicht ineinander übergehen können (vergl. Hull (26)).

Damit wäre das hier gezeigte Enzymmuster des inter-skapularen Fettgewebes des neugeborenen Meerschweinchens dasjenige der typischen multilokulären braunen Fettzelle, welches im Verlauf der postnatalen Involution zunehmend durch das der unilokulären weißen Fettzellen verdrängt wird.

ZUSAMMENFASSUNG:

Im interskapularen "braunen" Fettgewebe des Meerschweinchens wurden die Enzymaktivitäten der Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Lactatdehydrogenase (LDH), Pyruvatkinase (PK), Hexokinase (HK), Aldolase (ALD), Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGDH), Malat-Dehydrogenase (MDH), NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (IDH), Cytochrom C+C₁, Cytochrom A und Malat-Enzym (malic enzyme, ME) bestimmt. Meßprinzip war der enzymatisch optische Test und im Falle der Atmungspigmente die Bestimmung der Extinktionsdifferenz zwischen oxydiertem und reduziertem Cytochrom im Doppelstrahlphotometer nach Chance.

Im Hinblick auf die Bedeutung des braunen Fettgewebes für die chemische Wärmebildung, insbesondere bei Neugeborenen und nach Kälteadaptation, wurde geprüft, welchen Einfluß die Aufzucht der Umgebungstemperatur (Zimmertemperatur), bzw. bei Kälte (+ 8°C) auf das Enzymmuster des braunen Fettgewebes neugeborener Meerschweinchen hat. Hierzu wurden neugeborene, 5, 10, 15 und 22 Tage alte Tiere untersucht. Zur Frage eines etwaigen spezifischen Unterschiedes der Enzymausrüstung des braunen und weißen Fettes wurde weißes Abdominalfett erwachsener Meerschweinchen als Kontrolle in die Untersuchung einbezogen.

Im braunen Fett der neugeborenen Tiere fanden sich im Vergleich zum weißen Speicherfett deutlich höhere Spiegel der glykolytischen Enzyme und der Atmungspigmente. Während der postnatalen Entwicklung bei Zimmertemperatur nahmen insbesondere die Aktivitäten der Atmungspigmente sowie der GDH, IDH und des ME deutlich ab. Der Cytochrom-C-Gehalt betrug 3 Wochen nach der Geburt nur 1/5 des Wertes bei Neugeborenen. Diese Veränderung des Enzymmusters im braunen Fett ging zeitlich parallel mit der histologisch nachweisbaren Umwandlung der Fettzellen vom plurivakuolären Typ.

Bei Kälteaufzucht der Tiere ($+8^{\circ}\text{C}$) über 14 - 16 Tage nach der Geburt unterblieb in Übereinstimmung mit dem Erscheinen des plurivakuolären Zelltyps im interskapularen Fettkörper sowohl der Schwund der Cytochromgehalte als auch der glycolytischen Enzyme weitgehend. Die Befunde waren im Zusammenhang mit der Frage diskutiert, ob braune Fettzellen während der postnatalen Involution bei Wärmeaufzucht in weiße Fettzellen übergehen, oder ob die Veränderungen des Enzymspiegels auf einem fortschreitenden Ersatz der plurivakuolären Fettzellen des Neugeborenen durch univakuoläre Speicherzellen beruhen.

VI. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Material

Für die Versuche wurden Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen verwendet. Die Tiere wurden bei 25°C aufgezogen, bis sie das für die Versuche erforderliche Alter hatten. Sie wurden mit Möhren, Salat und Wasser ad libitum ernährt. Eine Tiergruppe wurde nach der Geburt 14 bis 16 Tage bei 8°C gehalten. Die Tiere wurden während der Zeit der Unterkühlung von dem Muttertier gesäugt. Das Tiermaterial wurde von der Fa. Horner, Nieder Klein, bezogen.

VI. 1). Gewebsentnahme

In leichter Äthernarkose wurde die Haut über der interskapularen Fettregion abpräpariert, sodaß das braune Fett frei sichtbar wurde. Anschließend wurde das braune Fett insgesamt exstirpiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, daß sich keine Muskulatur an dem exstirpierten Fetteil befand. Da der interskapuläre Fettkörper histologisch betrachtet inhomogen erscheint, d. h. der kaudale Anteil histologisch mehr dem weißen Fettgewebe gleicht (bes. bei Tieren die älter als 4 Tage sind), wurde bei jeder Gewebsentnahme der Fettkörper ~~into~~ exstirpiert und homogenisiert.

VI. 2). Enzymextraktion

Von dem entnommenen Gewebe wurde das Blut mit Filterpapier abgetupft und das Fettgewebe in ein mit Eis vorgekühltes Gefäß gegeben. Das Präparat wurde mit dem 10-fachen Volumen eines Extraktionsmediums (100 mM K-Phosphatpuffer pH 7.2 ;4mM EDTA) versetzt und 4 mal 30 Sekunden unter Eiskühlung in Abständen von ca. 1 Min. mit dem Ultraturrax (Fa. Jahnke-Kunkel) homogenisiert. Danach wurde das Homogenat 15 Min. bei 100 000 g in der Ultrazentrifuge (Fa. MSE) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation kann man ein Sediment, eine flüssige Phase und eine Fettschicht unterscheiden. Die flüssige Phase wurde mit einer Glasspritze abgezogen, sodaß kein Fett mit in den Extrakt gelangen konnte, und zur Enzymaktivitätsmessung verwendet. Alle Operationen wurden im Kältelabor bei + 4°C vorgenommen.

Die Fettschicht und das Sediment wurden nach oben beschriebener Methodik nachextrahiert. Die Aktivitätsbestimmung in diesem Nachextrakt ergab etwa für alle gemessenen Enzyme eine Restaktivität von ca. 10 %, die innerhalb der vorgenommenen Untersuchungen vernachlässigt wurde.

Messung der Enzymaktivität im optischen Test

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte im Photometer Eppendorf in einem thermokonstanten Küvettenhalter bei 25°C. Sämtliche Messungen wurden nach dem Prinzip des optischen Testes nach Warburg (55) durchgeführt. Gemessen wurde der Umsatz von Pyridinnukleotiden bei der Wellenlänge 366 m μ , Extinktionskoeffizient 3.3×10^6 [cm²/Mol,] Schichtdicke der Küvette = 1 cm. Die Angaben der Enzymaktivitäten erfolgte in internationalen Einheiten: mikro-Mol Substratumsatz/Min. Als Bezugssystem der Enzymaktivitäten wurde einmal die Gramm-Frischbasis gewählt. Doch ist die Aussagekraft innerhalb der Fragestellung dieser Arbeit zu gering, da der braune Fettkörper im Alter durch Wasser- und Fetteinlagerung an Gewicht zunimmt. Weiterhin wurde die Enzymaktivität auf das extrahierbare Protein bezogen (= Proteinmenge im 100 000 x g Überstand bestimmt). Da auch der Proteinanteil im braunen Fett innerhalb der Involution eine Abnahme zeigt, wurden die Enzymaktivitäten noch auf das oxydative Gärungsferment bezogen (GAPDH), das innerhalb der Involution eine gewisse Konstanz zeigt.

Die Testung nach Enzymaktivität im optischen Test erfolgte nach der Testzusammensetzung, wie sie von Bücher-Luh-Pette (25) für folgende Enzyme beschrieben wurden:

GAPDH, IDH, PK, HK, Ald., G-6-PDH, 6-PGDH, MDH, LDH, GDH. Das Hauptenzym ME wurde nach Hoppe-Seyler (25) bestimmt.

Bestimmung der Isocitratdehydrogenase (IDH)

Die IDH katalysiert die Reaktion :



Der Ablauf der Reaktion kann nach Warburg et al. (55) anhand der Absorptionsänderung verfolgt werden.

Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP ^x	50 mM
EDTA ^x	5 mM
MgSO ₄ ^x	8 mM
dl-Isocitrat	0.8 mM
NADP ^x	0.4 mM

pH = 7.6

t = 25°C

Der Test wird mit d-l-Isocitrat gestartet.

Messung bei 366 mμ ; d = 1 cm.

x)

TRAP	:	Triaethanolaminhydrochlorid
EDTA	:	Ethylenediamine Tetraacetic-Acid
MgSO ₄	:	Magnesiumsulfat
NADP	:	Nikotinamid-adenin-di-nukleotid-phosphat

Bestimmung der Pyruvatkinase (PK)

Die PK wird im zusammengesetzten, optischen Test nach Warburg et al. (55) bestimmt in folgender Reaktion:



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

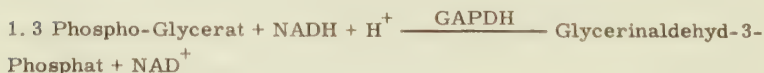
TRAP	50 mM	NADH	0.15 mM
EDTA	5 mM	ADP	1.5 mM
MgSO ₄	8 mM	PEP	0.8 mM
KCl ^x	75 mM	LDH	100 E/ml

pH = 7.6

t = 25°C.

Bestimmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Die GAPDH wird im zusammengesetzten optischen Test nach Warburg (55) bestimmt.



x)

PEP : Phosphoenolpyruvat

ADP : Adenosin-diphosphat

ATP : Adenosin-(5)-triphosphate

NADH+H⁺ : Nikotinamid-adenin-

dinukleotid red.

NAD⁺ : Nikotinamid-adenin-
dinukleotid

KCl : Kaliumchlorid

Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	3.3 mM
GSH ^x	2.4 mM
ATP	1.5 mM
3-PGS	7 mM
PGK ^x	200 E/ml

Die Reaktion wird mit Extrakt gestartet,

Messung bei 366 mμ; d = 1 cm

Aktivitätsangaben in IU

Bestimmung der Hexokinase (HK)

Die HK wird in dem zusammengesetzten, optischen Test nach

Warburg et al. (55) bestimmt in folgender Reaktion:



x)

GSH : Glutathion red.

PGK : Phosphoglukokinase

G-6P : Glukose-6-phosphat

Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
NADP	0.4 mM
Glukose	1 mM
ATP	1.5 mM
G-6-PDH	40 E/ml

pH = 7.6

t = 25°C

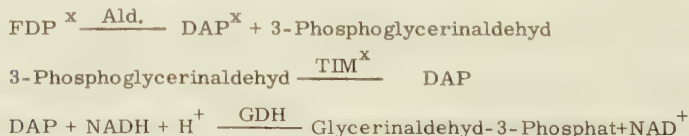
Der Test wird mit Extrakt gestartet,

Messung bei 366 mμ ; d = 1 cm,

Aktivitätsangaben in IU

Bestimmung der Aldolase (Ald.):

Die Aldolase wird in dem zusammengesetzten, optischen Test nach Warburg et al. (55) bestimmt in folgender Reaktion:



x)

FDP : Fruktose 1-6--diphosphat

TIM : Triose-Isomerase

DAP : Dihydroxyaceton Phosphat

Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
NADH	0.15 mM
FDP	4 mM
TIM	40 E/ml
GDH	60 E/ml

pH = 7.6

t = 25°C

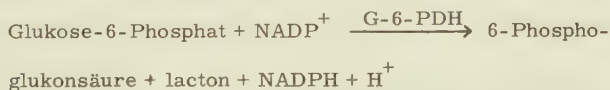
Die Reaktion wird mit Enzymextrakt gestartet ,

Messung bei 366 mμ; d = 1 cm ,

Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH)

Die G-6-PDH katalysiert folgende Reaktion :



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRA	50 mM
EDTA	5 mM
NADP	0.4 mM
G-6-P	2 mM

pH = 7.6

t = 25°C

Der Test wird mit Glukose-6-Phosphat gestartet.

Messung bei 366 m μ ; d = 1 cm

Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase (6-PGDH)

Die 6-PGDH katalysiert folgende Reaktion :



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
NADP	0,4 mM
6-PGS	1 mM

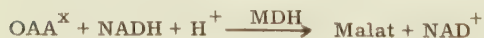
Der Test wird mit 6-Phosphoglukonat gestartet,

Messung bei 366 m μ ; pH 7,6 ; t = 25°C ; d = 1 cm

Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der Malatdehydrogenase (MDH)

Die MDH katalysiert folgende Reaktion:



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
NADH	0,15 mM
Oxalacetat	0,2 mM

x) OAA : Oxalacetat

pH = 7.5

t = 25°C

Der Test wurde mit OAA gestartet (OAA ist an jedem Versuchstag neu anzusetzen).

Messung bei 366 mμ; d = 1 cm, Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH).

Die LDH katalysiert folgende Reaktion:



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
NADH+H ⁺	0.15 mM
Pyruvat	2.4 mM

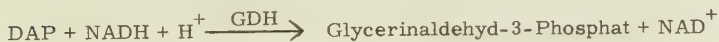
pH = 7.6

t = 25°C

Der Test wurde mit Pyruvat gestartet. Messung bei 366 mμ;
d = 1 cm, Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der Glycerin-3-Phosphat-dehydrogenase (GDH)

Die GDH katalysiert folgende Reaktion:



Testzusammensetzung:

Nach Bücher-Luh-Pette (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
NADH+H ⁺	0.15 mM
DAP	0.4 mM

pH = 7.6

t = 25°C

Der Test wird mit DAP gestartet; Messung bei 366 mμ;
d = 1 cm, Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung des Malic-Enzymes (ME).

Das ME katalysiert folgende Reaktion:



Testzusammensetzung:

Nach Ruther (25)

TRAP	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
NADP	0.4 mM
L-Malat	2 mM

pH = 7.6

t = 25°C.

Der Test wird mit Malat gestartet. Messung bei 366 mμ;
d = 1 cm; Aktivitätsangaben in IU.

Bestimmung der Cytochrome C + C₁ und A

Die Gewebe wurden wie unter VI 2 beschrieben entnommen, mit dem 10-fachen Volumen desselben Extraktionsmediums versetzt und 4 mal je 30 Sekunden mit Pausen unter Eiskühlung homogenisiert. Danach wurde der Extrakt bei 1000 g 5 Min. zentrifugiert und der trübe Extrakt zur Cytochrombestimmung nach der Methode von Klingenberg und Schollmeyer (43) verwendet.

Mit dem Doppelstrahlspektralphotometer nach Chance wurde die Extinktionsdifferenz der oxydierten und reduzierten Stufe gemessen; der oxydierte Zustand wurde durch Zugabe von Antimycin A (2 μ g in 1 ml Äthanol p. A. gelöst) eingestellt.

Dann reduziert man mit 4 mM Succinat und 2 mM KCN und registriert die Absorptionsänderung. Schichtdicke der Küvette 0.5 cm. Es wurde bei folgenden Wellenlängendifferenzen gemessen:

Cytochrom A 605 - 630 m μ , E_{mM} = 16
Cytochrom C+C₁ 550 - 540 m μ E_{mM} = 3.18
nach Klingenberg und Schollmeyer (43)

Bestimmung der Proteine

nach Weichselbaum, modifiziert nach Beisenherz et al. (1).

Es wurden 0.85 ml des, wie vorausgegangen beschrieben hergestellten, Enzymextraktes mit 0.15 ml 3 M Trichloressigsäure versetzt und der abzentrifugierte Niederschlag in 5.0 ml Biuretreagenz aufgenommen. Nach 30 Min. wurde mit Bidest. auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei der Wellenlänge 546 m μ gegen einen Leerwert im Photometer Eppendorf gemessen. Durchmesser der Küvetten 2 cm. Der Proteinwert wurde mit dem Umrechnungsfaktor 16.5 bestimmt.

Herstellung der histologischen Schnitte von braunem Fettgewebe.

Braunes, interskapuläres Fettgewebe wurde von Meerschweinchen post partum, 4 Tage und 8 Tage-alt untersucht.

Das interskapuläre Gewebe wurde insgesamt herausgenommen und in 4 %igem Formalin fixiert. Danach wurde das Material in Paraffin eingebettet und der Fettkörper flächenförmig in einer Dicke von 7 μ geschnitten. Anschließend wurden folgende Färbungen durchgeführt: Hämatoxylin-Eosin, Eisenhämatoxylin nach Heidenhain, Trichromfärbung nach Masson-Goldner (Technik siehe Romeis 1948 (41)).

In der Arbeit wurden nur Abbildungen, die mit Hämatoxylin nach Heidenhain gefärbt wurden, verwendet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leitz-Photomikroskop (Ortholux II) angefertigt.

Enzyme	M	n	S	$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$
Ald.	0.99	12	± 0.19	± 0.055
GAPDH	23.39	12	± 8.8	± 2.56
GDH	16.9	12	± 2.7	± 0.78
MDH	311	12	± 87.2	± 25.2
LDH	49.2	12	± 9.4	± 2.71
HK	1.36	12	± 0.23	± 0.066
G-6-PDH	2.84	9	± 0.42	± 0.14
6-PGDH	0.95	12	± 0.16	± 0.045
IDH	22.8	9	± 2.8	± 0.93
PK	19.4	11	± 6.3	± 1.89
ME	0.79	11	± 0.08	± 0.025
Cyt. C+C ₁	16.3	5	± 1.4	± 0.618
Cyt. A	12.4	5	± 3	± 1.34

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettgewebes des neugeborenen

Meerschweinchens

Angaben in IU/g-Frischgewicht

M = Mittelwert

n = Zahl der Versuche

S = Standardabweichung

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

TABELLE 2

Enzyme	M	n	S	$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$
GAPDH	43.2	11	± 22.7	± 6.85
Ald.	1.89	11	± 0.3	± 0.085
PK	33.5	11	± 8.3	± 2.52
HK	2.53	11	± 0.25	± 0.077
GDH	31.9	11	± 8.7	± 2.63
MDH	586	11	± 143	± 43.1
LDH	90.8	11	± 18.8	± 5.68
IDH	39.3	19	± 6.8	± 2.27
G-6-PDH	4.9	9	± 0.55	± 0.185
6-PGDH	1.76	11	± 0.38	± 0.117
ME	1.46	10	± 0.22	± 0.07

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettgewebes des neugeborenen Meerschweinchens.

Angaben in IU/100 mg extrahierbares Protein.

M = Mittelwert

S = Standardabweichung

n = Zahl der Versuche

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

TABELLE 3

Enzyme	5 Tage M	10 Tage M	15 Tage M	22 Tage M
GAPDH	18.76	11.6	11.7	9.44
Ald.	0.99	0.78	0.82	0.74
PK	15.5	10.5	6.11	7.0
HK	0.9	0.48	0.57	0.4
GDH	7.22	4.4	4.5	1.84
MDH	269	1.34	122.1	69.9
LDH	41.1	23.3	20.3	19.4
IDH	14.8	8.7	6.9	3.7
G-6-PDH	2.22	1.15	1.07	1.1
6-PGDH	0.62	0.46	0.46	0.42
ME	0.44	0.22	0.2	0.15
Cyt. C + C ₁	5.97	4.66	5.45	2.0
Cyt. A	4.5	3.24	2.54	3.89

Angaben in IU/g Frischgewicht

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettkörpers von Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen.

M = Mittelwert

TABELLE 4

Enzyme	5 Tage M	10 Tage M	15 Tage M	22 Tage M
GAPDH	55.2	45.5	28.8	44.4
Ald.	2.82	3.08	2.05	3.45
PK	45	41.8	17.5	31.5
HK	2.63	1.94	1.66	1.89
GDH	20.7	16.7	13.0	9.1
MDH	786	534	327.7	341
LDH	120	91	45.5	92
IDH	46.1	33.6	17.8	18.2
G-6-PDH	4.79	4.49	3.13	5.12
6-PGDH	1.8	1.88	1.29	2.02
ME	1.16	0.96	0.478	0.3

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettkörpers von
Meerschweinchen verschiedener Altersgruppen. Angaben in IU/100 mg
extrahierbares Protein.

M = Mittelwert

TABELLE 5

Enzyme	M	n	S	$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$
GAPDH	35.3	6	± 10.3	± 4.2
Ald. 1	1.94	6	± 0.8	± 0.10
PK	35.1	6	± 8.0	± 3.28
HK	1.83	6	± 0.42	± 0.17
GDH	10.17	6	± 5.8	± 2.38
MDH	352	6	± 156	± 63.8
LDH	69.2	6	± 26.4	± 10.74
IDH	23.0	6	± 4.61	± 1.88
G-6-PDH	1.43	6	± 0.2	± 0.08
6-PGDH	0.9	4	± 0.18	± 0.093
ME	0.36	4	± 0.56	± 0.28
Cyt. C + C ₁	19.1	5	± 3.21	± 1.43
Cyt. A	10.2	5	± 3.82	± 1.71

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettkörpers bei Meerschweinchen,

14 - 16 Tage bei 8°C aufgezogen.

Angaben in IU/g Frischgewicht

M = Mittelwert

n = Zahl der Versuche

S = Standardabweichung

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

TABELLE 6

Enzyme

GAPDH	57.2	6	± 15.14	± 6.20
Ald.	3.11	6	± 0.92	± 0.37
PK	56.3	6	± 9.7	± 4.0
HK	2.95	6	± 0.74	± 0.30
GDH	15.4	6	± 3.53	± 1.44
MDH	577	6	± 277	± 113.5
LDH	112	6	± 39.4	± 16.1
IDH	37.1	6	± 6.577	± 2.69
G-6-PDH	2.34	6	± 0.47	± 0.19
6 - PGDH	1.27	4	± 0.15	± 0.078
ME	0.52	4	± 0.125	± 0.062

Enzymaktivitäten des interskapularen Fettkörpers bei
Meerschweinchen 14 - 16 Tage bei 8° C aufgezogen. Angaben in
IU/100 mg extrahierbares Protein.

M = Mittelwert

n = Zahl der Versuche

S = Standardabweichung

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

TABELLE 7

Enzyme	M	M
GAPDH	11	85.2
Ald.	0.386	2.99
PK	5.34	41.3
HK	0.25	1.85
GDH	5.38	42.5
MDH	42.0	325
LDH	14.0	109.4
IDH	1.3	10.4
G-6-PDH	2.9	22.6
6-PGDH	0.66	5.13
ME	0.18	1.5
	Angaben in IU/g	Angaben in IU/100 mg
	Frischgewicht	extrahierbares Protein

Enzymaktivitäten des Abdominalfettes (weißes Fett).

M = Mittelwert

LITERATURVERZEICHNIS

- 1). Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G.
"Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang".
Zschr. f. Naturforschg. 8b, 555, 1953
- 2). Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chain, E. B., Pocchiari, F.
"Glucose Oxidation in rat brown adipose tissue homogenate".
Sel. Sci. Papers 1st. Super Sanita 2, 132, 1959
- 3). Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chain, E. B., Longinotti, L., Masi, I., Pocchiari, F.
"The stimulation of the phosphogluconate oxidation pathway by pyruvate under anaerobic conditions in diaphragm muscle and in rat brown adipose tissue".
Biochim. Biophys. Acta 56, 153, 1962
- 4). Bode, Chr., Klingenberg, M.
"Die Veratmung von Fettsäuren in isolierten Mitochondrien".
Biochem. Zschr. 341 (3), 271, 1965
- 5). Brück, K., Wünnenberg, B.
"Blockade der chemischen Thermogenese und Auslösung von Muskelzittern durch Adrenolytica und Ganglienblockade beim neugeborenen Meerschweinchen".
Pflügers Arch. 282, 376-389, 1965
- 6). Brück, K., Wünnenberg, B.
"Untersuchungen über die Bedeutung des multilokulären Fettgewebes für die Thermogenese des neugeborenen Meerschweinchens".
Pflügers Arch. 282, 1-16, 1965
- 7). Brück, K., Wünnenberg, B.
"Über die Modi der Thermogenese beim neugeborenen Warmblüter".
Pflügers Arch. 282, 262-375, 1966
- 8). Brück, K.
"The Mechanism of Cold-Induced Heat Production in Newborn Mammals".
Biometeorol. II., Pergamon Press 1966

- 9). Brück, K., Wünnenberg, B.

"Beziehung zwischen Thermogenese im "braunen" Fettgewebe, Temperatur im cervikalen Anteil des Vertebralkanals und Kältezittern".

Pflügers Arch. 290, 167-183, 1966

- 10). Brück, K., Wünnenberg, B.

"Alterations in the thermogenetic mechanism during postnatal development: the dependence on environmental temperature conditions".

Helgol. Wiss. Meeresunters. 14, 514-527, 1966

- 11). Brück, K., Wünnenberg, B.

"Influence of ambient temperature in the process of replacement of nonshivering by shivering thermogenesis during postnatal development".

Fed. Proc. 25 (4), 1332, 1966

- 12). Brück, K., Zeisberg, E.

"Zifferfreie Thermogenese beim Meerschweinchen; Mechanismus und Kapazität".

Pflügers. Arch. 294, 3, 85, 1967

- 13). Brück, K.

"Die Bedeutung des braunen Fettgewebes für die Temperaturregelung des neugeborenen und kälteadaptierten Säugers".

Naturwissensch. 7, 156-162, 1967

- 14). Cameron, I. L., Smith, R. E.,

"Cytohistological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats".

J. Cel. Biol. 23, 89, 1964

- 15). Creasey, N. H., Gray, C. H.

"Enzymes concerned in the synthesis of glycogen from glucose in the brown adipose tissue".

Biochem. J. 50, 74, 1952

- 16). Dettinger, E., Hirschhäuser, C., Schneider, C., Hohorst, H. J.

H. S. Zschr. Physiol. Chemie (in Druck).

- 17). Eichel, H. J.
"On some respiratory enzymes of rat adipose tissue"
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1, 293, 1959
- 18). Fawcett, D. W.
"A comparison of the histological organization and cytochemical reactions of brown and white adipose tissues".
J. Morphol. 90, 363, 1952
- 19). George, J. C., Eapen, J.
"The in vitro oxygen consumption by the brown and yellow adipose tissue of the rat".
Naturwissensch. 47, 258 (1960)
- 20). Gero, E.
"Ascorbic acid content of interscapular fat".
Arch. Sci. Physiol. 16, 121, 1962
- 21). Gessner, C.
Medici Tigurini Historiae Animilium 1551 bk. 2, pp. 840-843
- 22). Hatai, S.
"On the presence in human embryos of an interscapular gland corresponding to the so-called hibernating gland of lower mammals".
Anat. Anz. 21, 369, 1902
- 23). Hohorst, H. J., Stratmann, D.
"Oxidative Phosphorylation by Brown Fat Mitochondria of the guinea pig".
Europ. J. Biochem. (in Druck).
- 24). Hook, W. F., Barron, E. S. G.
"The respiration of brown adipose tissue and kidney of the hibernating and non-hibernating ground squirrel".
Am. J. Physiol. 133, 56, 1941
- 25). Hoppe-Seyler, Thierfelder
"Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse".
10. Auflage, 6. Bd. /A.

- 26). Hull, D.
"The structure and function of Brown Adipose Tissue".
Br. med. Bull. 22, 92, 1966
- 27). Johannson, B.
"Brown Fat : a review".
Metab. Clin. Exp. 8, 221, 1959
- 28). Joel, C.D., Ball, E.G.
"The electron transmitter system of brown adipose tissue".
Biochemistry 1, 281, 1962
- 29). Joel, C.D., Shackney, S.E.
"Respiratory metabolism of rat brown adipose tissue in vitro".
Federation Proc. 21,(2), 184, 1962
- 30). Kinsell, L.W. (Editor)
"Adipose tissue an organ".
Springfield, III.: Charles C. Thomas, 1962
- 31). Kornacker, M.S., Ball, E.G.
"Citrate cleavage in adipose tissue".
Proc. National Acad. Sci. 54, 899, 1965
- 32). Lachance, J.P., Page, F.
"Hormonal factors influencing fat deposition in the interscapular brown adipose tissue of the white rat".
- 33). Lever, J.D., Chapell, J.B.
"Mitochondria isolated from rat brown adipose tissue and liver".
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 287, 1958
- 34). Menschick, Z.
"Histochemical comparison of brown and white adipose tissue in the guinea pig".
Anat. Rec. 116, 439, 1953

- 35). Mrosovsky, N.
"Changes in multilocular brown adipose tissue in the rat following hypothermia".
Nature 196, 72, 1962
- 36). Napolitano, L., Fawcett, D. W.
"The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat".
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 685, 1958
- 37). Page, E., Babineau, L. M.
"The effect of cold environment on the hibernating gland of the rat".
Rev. Can. Biol. 9, 202, 1950
- 38). Rasmussen, A. T.
"The glandular status of brown multilocular adipose tissue".
Endocrinology 6, 760, 1922
- 39). Renolds, A. E.
"Das Fettgewebe: Ein wesentlicher Ort der Stoffwechselregulation".
Das Med. Prisma 1966, 6
- 40). Renold, A. E., Cahill, G. F.
"Handbook of Physiology : Adipose Tissue".
Am. Physiol. Soc. 1965, 5th. Section.
- 41). Romeis, B.
"Mikroskopische Technik".
München : Verlag Leibniz 15. Auflage 1948
- 42). Schmidt, E., Schmidt, F. W.
"Enzym-Muster menschlicher Gewebe".
Klin. Wochenschrift 38, (19), 957, 1960
- 43). Schollmeyer, P., Klingenberg, M.
"Über den Cytochromgehalt tierischer Gewebe".
Biochem. Zschr. 335, 426, 1962
- 44). Shapiro, B., Wertheimer, E.
"The metabolic activity of adipose tissue".
Metab. Clin. Exptl. 5, 79, 1956
- 45). Smalley, R. L.
"Chemistry and function of brown fat in hibernating mammals".
Dissertation der Universität Iowa, 1963

- 46). Smith, R. E.
 "Thermogenetic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat".
 The Rhysiologist 4, (3), 113, 1961
- 47). Smith, R. E.
 "Cold-acclimation - An altered steady State".
 J. Am. Med. Assoc. 179, 110, 1962
- 48). Smith, R. E.
 "Thermoregulation by brown adipose tissue in cold".
 Federation Proc. 21, 221, 1962
- 49). Smith, R. E., Hock, R. J.
 "Brown Fat : Thermogenic effector of arousal in hibernators".
 Science 140, 199, 1963
- 50). Smith, R. E., Hock, R. J.
 "Thermogenesis of brown fat in the hibernator".
 Federation Proc. 22, 341, 1963
- 51). Smith, R. E., Hoijer, D. J.
 "Metabolism and cellular function in cold acclimation".
 Physiol. Rev. 42, 60, 1962
- 52). Smith, R. E., Roberts, J. C.
 "Thermogenesis of brown adipose tissue in cold-acclimated rats".
 Am. J. Physiol. 206, 143, 1964
- 53). Stratmann, D., Hohorst, H. J.
 "Mitochondria of brown adipose tissue involution and cold-adaption".
 Europ. J. Biochem. (in Druck).
- 54). Treble, D. B., Ball, E. G.
 "The occurence of glycerokinase in rat brown adipose tissue".
 Fed. Proc. 22, 357, 1963
- 55). Warburg, O., Christian, W., Griese, A.
 "Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise".
 Biochem. Zschr. 282, 3/4, 157, 1935

- 56). Weber, G., Banerjee, G., Ashmore, J.

"Activities of enzymes involved in glycolysis, glucogenesis and hexosemonophosphate shunt in rat adipose tissue".

Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 182, 1960

- 57). Wise, E. M., Ball. E. G.

"Malic enzyme and lipogenesis".

Proc. National Acad. Sci. 52, 1255, 1964

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bickel, Bommer, Braun-Falco, Brück
Buchholz, Bücher, Dimroth, Drawert, Erhardt, Exner,
Gedigk, Hamm, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jakob,
Klingenberg, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers,
Mahr, Mann, Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont,
Neubauer, Niessing, Petry, Petzold, Schermoly, Schleyer,
Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Spiegelberg, Straub,
Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würtele, Zilliken.

LEBENS LAUF

Am 14. Februar 1941 wurde ich als zweiter Sohn des Dipl. -Kfm. Walter Hirschhäuser und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Jechow, in Weilburg an der Lahn geboren.

Dort besuchte ich von 1947 bis Herbst 1951 die Grundschule. Von 1951 bis 1953 war ich als Choralumne in dem Sing-alumnat in Laubach und war von Ostern 1952 bis Herbst 1953 Schüler der Paul-Gerhard-Schule.

Nachdem meine Eltern den Wohnsitz nach Marburg verlegt hatten, besuchte ich die Steinmühle in Cappel bei Marburg, die ich 1961 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Sommersemester 1961 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg mit dem Studium der Medizin. Im März 1962 bestand ich den ersten Teil und im August 1963 den zweiten Teil der Ärztlichen Vorprüfung. Im März 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen und seit dem 1. April des gleichen Jahres bin ich als Assistent im Physiologisch-Chemischen Institut bei Herrn Professor Zilliken angestellt.

Herrn Professor Dr. Dr. H. J. Hohorst darf ich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, die stetige Unterstützung und vielseitigen Anregungen, die ich in seinem Arbeitskreis erhalten habe, vielmals danken.

Herrn Dr. B. Kadenbach, Abtl. Professor Dr. M. Klingenberg, danke ich für die Bestimmung der Cytochrome

